Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

**Демченко Вікторія Олександрівна**

УДК 615.282.31:[547.77:547.654.1].011

**АНАЛІТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ**

**В РЯДІ ПРОТИГРИБКОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ**

**ПОХІДНИХ АЗОЛІВ ТА НАФТИЛМЕТИЛЕНАМІНУ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата фармацевтичних наук

Львів – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету Міністерства охорони здоров’я України.

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор

**Петренко Володимир Васильович,**

Запорізький державний медичний університет,

завідувач кафедри аналітичної хімії

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор

**Музиченко Володимир Афанасійович,**

Львівський національний медичний університет

імені Данила Галицького,

професор кафедри фармацевтичної, органічної та

біоорганічної хімії

доктор фармацевтичних наук, професор

**Бондар Володимир Степанович,**

Національний фармацевтичний університет,

завідувач кафедри токсикологічної хімії

Захист відбудеться «25» червня 2009 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (79000, м. Львів, вул. Січових Стрільців, 6).

Автореферат розісланий «22» травня 2009 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Гасюк Г.Д.

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми**. В Україні, як і в усьому світі, спостерігається помітне збільшення захворюваності населення на мікози. За даними ВООЗ, грибковими недугами страждає кожна четверта людина планети. Не дивлячись на всі старання медиків, рівень захворюваності залишається високим, що говорить про масове розповсюдження грибкових захворювань серед населення, в тому числі і у нашій країні.

Одним з основних напрямків у вирішенні цієї проблеми є використання лікарських засобів, здатних впливати на грибки. Більшу частину асортименту антимікотиків складають представники похідних азолів – імідазолу, тріазолу. Інтерес також виявляється до похідних нафтилметиленаміну, кількість яких останнім часом збільшується на фармацевтичному ринку, як правило, за рахунок відтворених препаратів. Тому, для ефективного та безпечного застосування препаратів цієї групи, необхідно підвищувати вимоги щодо контролю якості лікарських засобів шляхом розробки нових, а також удосконалення та уніфікації існуючих методів фармацевтичного аналізу.

Більшість наукових досліджень у цьому напрямку базується на розробці сучасних методик аналізу лікарських речовин, а також на пошуку нових шляхів при використанні вже відомих способів ідентифікації та кількісного визначення.

У наш час у фармацевтичному аналізі домінують фізико-хімічні методи, найбільш доступними та надійними з яких є методи спектрофотометричного та хроматографічного аналізу. Серед них доступністю та простотою виконання характеризується спектрофотометрія у видимій області спектра. Загальною проблемою розвитку цього методу є пошук доступних, достатньо селективних, високочутливих реагентів, оскільки існуючий асортимент кольорореагентів не завжди може використовуватись у кількісному спектрофотометричному аналізі лікарських засобів. Достатньої уваги заслуговують хроматографічні методи, зокрема високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Отже, розробка простих у виконанні способів кількісного визначення лікарських речовин спектрофотометричними та хроматографічними методами є актуальною проблемою фармацевтичної науки і практики.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом проблемної комісії «Фармація» МОЗ та АМН України та планом наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом комплексної теми «Застосування фізико-хімічних методів для аналізу якості лікарських засобів, похідних 3-кетостероїдів, азолів та інших» (№ державної реєстрації 0106U008116, шифр теми ІН 15.00.02.06).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дослідження є наукове обґрунтування та розробка чутливих, простих у виконанні спектрофотометричних та хроматографічних методик кількісного аналізу лікарських засобів протигрибкової дії похідних азолів та нафтилметиленаміну, в тому числі на основі їх реакцій з алізаринами та алюміноном.

Для досягнення поставленої мети вирішувались такі завдання:

- провести моніторинг вітчизняного фармацевтичного ринку протигрибкових лікарських засобів, на прикладі похідних азолів та нафтилметиленаміну;

- визначити основні оптичні характеристики електронних спектрів поглинання досліджуваних лікарських речовин для можливого застосування їх при визначенні тотожності;

- встановити оптимальні умови кількісного утворення продуктів реакції алізаринового червоного С та алюмінону з досліджуваними лікарськими речовинами похідними азолів і нафтилметиленаміну, розрахувати аналітичні показники чутливості реакцій;

- встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень “реагент – лікарська речовина”, визначити напрямок та запропонувати ймовірний хімізм реакцій;

- розробити спектрофотометричні методики кількісного визначення та провести їх валідацію;

- встановити оптимальні умови проведення високоефективної рідинної хроматографії лікарських речовин похідних азолів та нафтилметиленаміну та розробити методики їх кількісного визначення у лікарських формах;

- впровадити розроблені методики кількісного визначення у роботу територіальних Державних інспекцій з контролю якості лікарських засобів.

*Об’єкти дослідження.* Лікарські речовини протигрибкової дії похідні азолів – імідазолу, тріазолу та нафтилметиленаміну.

*Предмет дослідження.* Розробка науково обґрунтованих спектрофотометричних та хроматографічних методик кількісного аналізу протигрибкових лікарських речовин похідних азолів – імідазолу, тріазолу та нафтилметиленаміну.

*Методи дослідження.* Для розробки нових методик кількісного аналізу лікарських речовин похідних азолів та нафтилметиленаміну застосовано спектрофотометрію у видимій області спектру, високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ). Стехіометричні співвідношення реагуючих речовин встановлювали фотометричними методами насичення та ізомолярних серій. Обробку спектрів проводили з використанням програмного пакету WinASPECT 2.2.1.0. Обробка хроматограм проводилась із застосуванням програмного забезпечення Totalchrom 6.3.1.0504. Для розрахунків електронної густини вихідних речовин використовували програмний пакет „CS ChemOffice v.8.0”. Побудову графіків проводили з використанням програми «Sigma Plot v.11».

**Наукова новизна одержаних результатів.** Науково обґрунтована та експериментально доведена можливість застосування алізаринового червоного С і алюмінону у фармацевтичному аналізі для кількісного визначення лікарських речовин похідних азолів та нафтилметиленаміну. Встановлені оптимальні умови перебігу реакції алізаринового червоного С та алюмінону з лікарськими речовинами, розраховані аналітичні показники чутливості реакцій.

Визначені основні оптичні характеристики електронних спектрів поглинання досліджуваних лікарських речовин, похідних азолів та нафтилметиленаміну в амфіпротних, протогенних і протофільних розчинниках, які можуть бути застосовані для ідентифікації досліджуваних речовин.

Визначені коефіцієнти стехіометричних співвідношень “реагент – лікарська речовина”, виявлена направленість реакцій досліджуваних лікарських речовин з алізариновм червоним С і алюміноном та запропоновано ймовірний хімізм реакцій.

Встановлено оптимальні умови кількісного визначення флуконазолу і тербінафіну гідрохлориду в їх лікарських формах на підставі аналізу характеристик і параметрів хроматографування.

Наукова новизна одержаних результатів захищена 2 деклараційними патентами України та 1 нововведенням.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено 18 нових, чутливих, простих у застосуванні спектрофотометричних та хроматографічних методик кількісного аналізу 5 лікарських речовин в лікарських формах промислового виробництва. Розширено асортимент аналітичних реагентів для кількісного спектрофотометричного аналізу.

Методики впроваджені в практику роботи лабораторій Державних інспекцій з контролю якості лікарських засобів Запорізької, Кіровоградської, Дніпропетровської, Миколаївської, Чернігівської областей та м. Києва (акти впровадження від 25.02.08 р., 28.01.08 р., 25.03.08 р., 30.01.08 р., 28.01.08 р., 29.01.08 р. відповідно).

Результати досліджень знайшли впровадження в навчальному процесі при викладанні курсу фармацевтичної хімії у Національному фармацевтичному університеті (м. Харків), Запорізькому державному медичному університеті, Одеському державному медичному університеті, Національному медичному університеті ім. О.О. Богомольця, Тернопільському державному медичному університеті ім. І.Я. Горбачевського.

„Спосіб кількісного визначення кетоконазолу у супозиторіях» включено до галузевого реєстру нововведень МОЗ України за 2008 р. (реєстр. № 307/29/08).

**Особистий внесок здобувача.** Особисто дисертантом здійснено пошук і аналіз даних наукової літератури стосовно проблеми, що вивчається, виконана експериментальна частина дисертаційної роботи, проведена графічна та статистична обробка одержаних результатів. Автором написані всі розділи дисертаційної роботи, сформульовані висновки та запропоновані практичні рекомендації. Постановка задачі та обговорення результатів проведені з науковим керівником.

У дисертації не були використані ідеї або розробки, що належать співавторам, разом з якими були опубліковані наукові праці.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень доповідались та обговорювались на Міжрегіональній науково-практичній конференції «Актуальні питання фармацевтичної науки та практики» (Запоріжжя, 1995 р.), І-й Міжнародній науково-практичній конференції «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2006 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної науки та практики» (Запоріжжя, 2006 р.), Міжвузівській студентській науковій конференції «Сучасні екологічні проблеми та молодь - ІІІ» (Запоріжжя, 2006 р.), ІІ-й Міжнародній науково-практичній конференції «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2007 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення в галузі аналітичної, судово-медичної, клінічної токсикології та наркології» (Запоріжжя, 2007 р.), Всеукраїнському конгресі «Сьогодення та майбутнє фармації» (Харків, 2008 р.), II Міжнародному форумі «Аналитика и аналитики» (Воронеж, 2008 р.)

**Публікації.** За результатами дисертаційних досліджень опубліковано 18 наукових робіт, у тому числі 7 статей, з них 6 - у фахових виданнях, 9 тез доповідей, отримано 2 деклараційних патенти на винаходи.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 202 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), об’єктів і методів дослідження (розділ 2), експериментальної частини досліджень (розділи 3-5), загальних висновків, додатків, списку використаних джерел літератури. Основний обсяг дисертації становить 141 сторінку, робота вміщує 50 таблиць (36 с.), ілюстрована 27 рисунками (12 с.) та містить 15 додатків (18 с.). Список використаної літератури включає 200 джерел.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**У вступі** викладено актуальність теми, мету та основні завдання досліджень, наукову новизну і практичне значення одержаних результатів.

**У першому розділі** дисертації на підставі літературних даних проведено вивчення вітчизняного фармацевтичного ринку протигрибкових препаратів похідних азолів та нафтилметиленаміну, для яких описані спектрофотометричні, електрохімічні та хроматографічні методики кількісного визначення. Обґрунтовано доцільність розробки та впровадження нових, простих у виконанні, доступних методів кількісного аналізу.

**У другому розділі** наведено інформацію щодо об’єктів, реагентів та методів дослідження.

**У третьому розділі** дисертації проаналізовані УФ-спектри речовин, що досліджувалися, розраховані їх оптичні характеристики, такі як: сила осцилятора електронних переходів, матричний елемент переходу, що можуть застосовуватись як важливі аналітичні показники для ідентифікації, встановлення більш глибокого зв’язку між спектрами і будовою молекул. Для кількісного визначення досліджуваних речовин нами було проведено фотометричні реакції з алізаринами та алюміноном.

**Вивчення умов реакцій алізаринового червоного С і алюмінону з досліджуваними речовинами**

На результати проведення аналітичних реакцій впливає багато чинників, тому об’єктивний вибір оптимальних умов кількісного спектрального

аналізу можливо здійснити тільки після проведення попередніх досліджень.

Так, нами був обраний серед алізаринів, як кольорореагент, алізариновий червоний С (натрієва сіль 9,10-дигідро-3,4-дигідрокси-9,10-діоксо-2-антраценсульфокислоти), який з кетоконазолом і клотримазолом утворював забарвлений продукт реакції.

Для розробки способів кількісного визначення цих лікарських речовин на підставі їх реакцій з алізариновим червоним С нами вивчались природа розчинника, кількість реагенту, порядок додавання реагентів, час перебігу реакції та стійкість продукту реакції з часом.

При виборі розчинника враховувалась розчинність субстанції препарату, реагенту та кількісний вихід забарвленого продукту. Досліджувалися в якості розчинників вода очищена, 1,4-діоксан, 1-пропанол, 2-пропанол, етанол, ацетон, кислота оцтова льодяна. Виходячи з максимального виходу продукту реакції, його розчинності та стійкості, а також, враховуючи доступність розчинників, реакцію запропоновано проводити в етанольно-водному середовищі.

Необхідну кількість реагенту визначали експериментально за максимальним виходом продукту реакції, тобто величиною оптичної густини. Подальші наші дослідження показали, що концентрація розчину алізаринового червоного С може бути використана від 0,5 до 1,0%.

Реакція проходить при кімнатній температурі (18-250С).

Експериментально було досліджено, що величини оптичної густини отриманих продуктів реакції практично не змінюються протягом 30 хвилин і більше.

Для розробки способів кількісного визначення солей органічних основ – тербінафіну гідрохлориду і міконазолу нітрату з використанням їх реакції з алюміноном нами вивчались вищенаведені умови.

В якості розчинника обраний етанольно- водний з вмістом етанолу 20-28%.

Концентрація розчину реагенту може коливатися в інтервалі від 0,2 до 0,7%.

Реакція протікає швидко при кімнатній температурі (18-250С).

Експериментально встановлено, що забарвлення отриманих продуктів реакції стабільне протягом більше 30 хвилин і величина оптичної густини не змінюється в часі.

В оптимальних умовах проведення реакції алізаринового червоного С та алюмінону були отримані спектри поглинання продуктів реакцій та знайдені їх максимуми поглинання, при яких розраховували показники чутливості відповідних реакцій. Отримані дані свідчать про достатню чутливість реакцій алізаринового червоного С і алюмінону з досліджуваними лікарськими речовинами - межі виявлення становлять 3,83-3,95 мкг/мл за реакцією з алізариновим червоним, 11,32 - 18,20 мг/мл за реакцією з алюміноном.

На прикладі реакції кетоконазолу з алізариновим червоним С за розрахунковими даними розподілу електронної густини в молекулах вихідних речовин запропоновано можливий хімізм реакції.

Для досягнення поставленої мети було застосовано програму «МОРАС» з параметрами: заряди по Р. Малликену; метод NMDO/3; хвильова функція – закрита оболонка.

Розподіл електронної густини в молекулах кетоконазолу та алізаринового червоного С наведено на діаграмах (рис. 1, 2).



Рис. 2. Діаграма розподілу електронної густини кетоконазолу.

Рис. 1. Діаграма розподілу електронної густини алізаринового червоного С.

Вивчаючи діаграму розподілу електронної густини в молекулі алізаринового червоного С (рис. 1), можна зробити висновок про те, що в даній молекулі електронодефіцитом є хіноїдний фрагмент; фенольні гідроксильні групи в положенні 1 і 2 антрахінонового циклу (-0,48790, -0,49178) виявляють кислотні властивості. В молекулі кетоконазолу (рис. 2) присутні два основних центри: один в кільці піперазину (-0,15876), який по своїй природі аліфатичний, а другий в кільці імідазолу (-0,15824) – «піридиновий» атом азоту, який має ароматичні властивості.

На підставі квантово-хімічних розрахунків розподілу електронної густини молекул кетоконазолу і алізаринового червоного С, а також реакцій алізаринового червоного С з модельними азотовмісними сполуками (морфолін, тощо) нами була встановлена тотожність спектрів поглинання продуктів реакцій, що свідчить про перебіг реакції поміж сполуками за типом іонного асоціату. На нашу думку, участь у реакції утворення асоціату приймає фенольний гідроксил у положенні 2 молекули алізаринового червоного С та нітроген піперазину молекули кетоконазолу.

Аналогічні дані одержані для реакції алізаринового червоного С з клотримазолом.

Виходячи з електронної і просторової будови алюмінону, у реакцію вступає оксиген гідроксильного атому карбоксильної групи в орто-карбоксифенольному кільці, а по атому оксигену хіноїдної системи, при наведених вище умовах, реакція не проходить.

Таким чином, ми допускаємо, що у ході реакції утворюється іонний асоціат. Про це свідчить і той факт, що при рН ~ 10,00 цей комплекс руйнується – червоне забарвлення зникає і на спектрі у досліджуваному діапазоні хвиль не спостерігається максимумів. Реакцію алюмінону з тербінафіну гідрохлоридом можна представити схемою (рис. 3).



+ 2

Рис. 3. Схема реакції тербінафіну гідрохлориду з алюміноном.

Аналогічно перебігає реакція між алюміноном та міконазолу нітратом.

**Встановлення складу продуктів реакції алізаринового червоного С і алюмінону з досліджуваними речовинами**

Для визначення складу та будови продуктів реакцій нами попередньо встановлювалось співвідношення компонентів реакції: лікарська речовина - реагент. Для цього були використані найбільш поширені методи: метод неперервних змін (метод ізомолярних серій) та метод насичення (метод молярних відношень).

Аналіз результатів методів неперервних змін (рис. 4, 6) і насичення (рис. 5, 7) показує, що алізариновий червоний С з кетоконазолом реагує в еквімолярному співвідношенні 1:1, а алюмінон з тербінафіну гідрохлоридом у співвідношенні 1:2.

Експериментально встановлено, що збільшення відсоткового вмісту етанолу при проведенні реакції з алюміноном приводило до співвідношення компонентів системи 2:3.





Рис. 5. Криві насичення: 1 - кетоконазолу при постійній концентраціії алізаринового червоного С; 2 – алізаринового червоного С при постійній концентрації кетоконазолу.

Рис. 4. Графік залежності величини оптичної густини від складу ізомолярного розчину (С1 – 0,002 М розчин кетоконазолу, С2 – 0,002 М розчин алізаринового червоного С).





Рис. 6. Графік залежності величини оптичної густини від складу ізомолярного розчину (С1 – 0,01 М розчин тербінафіну гідрохлориду, С2 – 0,01 М розчин алюмінону) при вмісті 28% етанолу.

Рис. 7. Криві насичення: 1 – алюмінону при постійній концентрації тербінафіну гідрохлориду, 2 - тербінафіну гідрохлориду при постійній концентраціії алюмінону.

За аналогією було отримано результати досліджень при взаємодії алізаринового червоного С з клотримазолом і алюмінону з міконазолу нітратом.

**У четвертому розділі** представлено результати з розробки спектрофотометричних методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин в протигрибкових препаратах переважно вітчизняного виробництва, в таких лікарських формах, як таблетки, мазь, крем, супозиторії, розчин.

Способи здійснюються згідно методик: до аліквотної частини розчиненої в етанолі проби кетоконазолу або клотримазолу додають водний розчин алізаринового червоного С, воду очищену з наступним вимірюванням оптичної густини забарвленого розчину; пробу міконазолу нітрату або тербінафіну гідрохлориду розчиняють в етанолі, до аліквотної частини етанольного розчину проби додають водний розчин алюмінону, воду очищену з наступним вимірюванням величини оптичної густини забарвленого розчину на фоні компенсаційного розчину, який не містить досліджуваної речовини.

Розроблені методики є достатньо вибірковими, оскільки реакціям із зазначеними реагентами не заважають допоміжні речовини, а тому при аналізі не має потреби у попередньому виділенні випробуваної речовини, що підвищує експресність аналізу в цілому.

Переваги розроблених способів спектрофотометричного визначення досліджуваних речовин з кольорореагентами представлені в табл. 1.

**Валідаційні характеристики методик кількісного визначення досліджуваних речовин у лікарських формах**

Згідно з вимогами Державної Фармакопеї України (ДФУ), методики кількісного визначення лікарських засобів, які включаються до аналітичної нормативної документації, мають бути валідовані.

Експеримент з випробування «Кількісне визначення» для лікарських форм – таблеток, розчину, супозиторіїв, мазі та крему досліджуваних речовин проводився за рекомендаціями ДФУ.

*Прогноз невизначеності аналізу*

Для оцінки коректності кожної методики для виконання аналізу в інших лабораторіях було визначено прогноз невизначеності аналізу. На підставі того, що повну невизначеність (*ΔAs*) можна розбити на складові, пов’язані з невизначеністю пробопідготовки (*ΔSP*) і з невизначеністю кінцевої аналітичної операції (*ΔFAO*), нами були розраховані ці характеристики і визначена повна прогнозована невизначеність аналізу. Результати наведені у табл. 2.

*Діапазон застосування аналітичної методики*

Згідно з вимогами ДФУ мінімальний діапазон застосування для методик кількісного визначення становить 80 – 120%, в межах якого і проводився експеримент для кожної методики.

*Специфічність*

Для підтвердження специфічності методики розраховували відносну

систематичну похибку, яку вносять допоміжні речовини і розчинники.

Так, розчини плацебо досліджуваних речовин не поглинають при аналітичній довжині хвилі і тому знайдені їх значення величини оптичної густини (*Аblank*) свідчать, що вклад плацебо в сумарне поглинання препаратів відсутній.

*Таблиця 1*

**Переваги розроблених способів кількісного аналізу в порівнянні з офіцінальними**



*Таблиця 2*

**Повна прогнозована невизначеність аналізу**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Критерії прийнятості | Результат | Відповідність |
| Кількісне визначення кетоконазолу у таблетках по 200 мг | | |
| *ΔAs* ≤ 1,60 | *ΔAs* = = 1,40 | Відповідає |
| Кількісне визначення кетоконазолу у 2% кремі | | |
| *ΔAs* ≤ 3,20 | *ΔAs* = = 1,35 | Відповідає |
| Кількісне визначення кетоконазолу у супозиторіях по 0,4 г | | |
| *ΔAs* ≤ 3,20 | *ΔAs* = = 1,48 | Відповідає |
| Кількісне визначення клотримазолу в 1% розчині | | |
| *ΔAs* ≤ 3,20 | *ΔAs* = = 1,21 | Відповідає |
| Кількісне визначення клотримазолу в 1% мазі | | |
| *ΔAs* ≤ 3,20 | *ΔAs* = = 1,21 | Відповідає |
| Кількісне визначення клотримазолу у таблетках по 0,1 г | | |
| *ΔAs* ≤ 2,40 | *ΔAs* = = 1,21 | Відповідає |
| Кількісне визначення тербінафіну гідрохлориду у таблетках по 250 мг | | |
| *ΔAs* ≤ 1,60 | *ΔAs* =  = 1,21 | Відповідає |

*Робасність*

Була визначена стійкість аналітичних розчинів у часі, яка є характеристикою робасності. Результати для кожної методики подані в табл. 3.

*Таблиця 3*

**Стійкість аналітичних розчинів у часі (робасність)**

|  |  |
| --- | --- |
| Критерії прийнятості | Результат |
| 1 | 2 |
| Кількісне визначення кетоконазолу у таблетках по 200 мг | |
| *Δt% ≤ max δ%* = 0,51 | Для досліджуваного інтервалу часу в 1 годину виконується критерій: 0,20 *≤* 0,51 |
| Кількісне визначення кетоконазолу у 2% кремі | |
| *Δt% ≤ max δ, % =*1,02 | Для досліджуваного інтервалу часу в 1 годину виконується критерій: 0,93 *≤* 1,02 |
| Кількісне визначення кетоконазолу у супозиторіях по 0,4 г | |
| *Δt% ≤ max δ, % =*1,02 | Для досліджуваного інтервалу часу в 1 годину виконується критерій: 0,94 *≤* 1,02 |
| Кількісне визначення клотримазолу в 1% розчині | |
| *Δt% ≤ max δ, % =*1,02 | Для досліджуваного інтервалу часу в 30 хвилин виконується критерій: 0,67 *≤* 1,02 |
| Кількісне визначення клотримазолу в 1% мазі | |
| *Δt% ≤ max δ, % =*1,02 | Для досліджуваного інтервалу часу в 30 хвилин виконується критерій: 0,46 *≤* 1,02 |
| Кількісне визначення клотримазолу у таблетках по 0,1 г | |
| *Δt% ≤ max δ, % =*1,02 | Для досліджуваного інтервалу часу в 30 хвилин виконується критерій: 0,35 *≤* 0,77 |

*Продовж. табл. 3*

|  |  |
| --- | --- |
| 1 | 2 |
| Кількісне визначення тербінафіну гідрохлориду у таблетках по 250 мг | |
| *Δt% ≤ max δ%* = 0,51 | Для досліджуваного інтервалу часу в 1 годину виконується критерій: 0,38 ≤ 0,51 |

*Лінійність, правильність і прецизійність*

Лінійність, правильність і прецизійність проводили одночасно згідно з рекомендаціями ДФУ. Для цього вивчалося 9 точок у межах досліджуваного діапазону (80-120%). Розрахунок параметрів лінійної залежності (*Y = b·X +a)* проводили за допомогою методу найменших квадратів. Одержані величини *b (*кутовий коефіцієнт лінійної залежності)*, a* (вільний член лінійної залежності), *sb, sa* (стандартні відхилення для *b і a*), *sr* (залишкове стандартне відхилення) і *Rc* (коефіцієнт кореляції) вказують, що усі вимоги щодо наведених параметрів підтверджуються у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій (табл. 4).

Для оцінки правильності та прецизійності на рівні збіжності використовували усі результати, одержані при вивченні лінійності за відношенням «знайдено/введено».

*Таблиця4*

**Метрологічні характеристики лінійної залежності**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Лікарська форма | *Rc* | *Sr* | *а* | *Sa* | *b* | *Sb* |
| Таблетки кетоконазолу по 200 мг | 0,99918 | 0,60299 | 0,47418 | 1,55227 | 0,99719 | 0,01531 |
| 2% крем кетоконазолу | 0,99963 | 0,44271 | -0,60071 | 1,02480 | 1,00414 | 0,01033 |
| Супозиторії кетоконазолу по 0,4 г | 0,99943 | 0,52875 | 0,78399 | 1,40469 | 0,99380 | 0,01264 |
| Таблетки вагінальні клотримазолу по 0,1 г | 0,99977 | 0,00136 | 0,17837 | 0,00456 | 0,08288 | 0,00073 |
| 1% розчин клотримазолу | 0,99909 | 0,00262 | 0,21623 | 0,00965 | 0,09012 | 0,001567 |
| 1% мазь клотримазолу | 0,99792 | 0,00789 | -0,1146 | 0,02522 | 0,15599 | 0,004112 |
| Таблетки тербінафіну гідрохлориду по 250 мг | 0,99996 | 0,17839 | 0,04223 | 0,32920 | 1,00038 | 0,003279 |

Виконується критерій незначущості систематичної та практичної похибок *δ*, отже методики аналізу визначення характеризується достатньою правильністю у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій.

Методики є точними на рівні збіжності, так як значення відносних довірчих інтервалів (*Δz)* кожної методики менше критичних результатів (*ΔAs)* (табл. 5).

*Таблиця 5*

**Визначення правильності та прецизійності на рівні збіжності**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Лікарська форма | Довірчий інтервал, *Δz* | Критичне значення для збіжності результатів , Δ*As* | Висновок |
| Таблетки кетоконазолу по 200 мг | 0,99 | 1,60 | Відповідає |
| 2% крем кетоконазолу | 0,80 | 3,20 | Відповідає |
| Супозиторії кетоконазолу по 0,4 г | 0,93 | 3,20 | Відповідає |
| Таблетки вагінальні клотримазолу по 0,1 г | 1,50 | 2,40 | Відповідає |
| 1% розчин клотримазолу | 2,52 | 3,20 | Відповідає |
| 1% мазь клотримазолу | 1,43 | 3,20 | Відповідає |
| Таблетки тербінафіну гідрохлориду по 250 мг | 0,28 | 1,60 | Відповідає |

Таким чином, експериментально доведено, що розроблені методики кількісного визначення придатні для вирішення поставленого завдання.

**У п’ятому розділі** наведені результати експериментальних досліджень з оптимізації умов для кількісного визначення флуконазолу і тербінафіну гідрохлориду методом зворотно-фазової (ЗФ) високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

У ході попередніх досліджень вивчали такі умови, як: розміри хроматографічної колонки, тип нерухомої фази, розмір часток нерухомої фази, температура колонки, склад рухомої фази та швидкість з якою вона подається, спосіб детектування.

У результаті експерименту були встановлені оптимальні умови *кількісного визначення флуконазолу у лікарських формах – таблетках і капсулах*:

* хроматографічна колонка: 250 х 4,6 мм, заповнена сорбентом Diasopak C18 з розміром часток 5 мкм або аналогічна, яка задовольняє вимогам тесту «Придатність хроматографічної системи»;
* буферний розчин з рН 3,0, який готують таким чином: 2,0 г амонію ацетату безводного і 1,0 г натрію гептансульфонату вміщують у мірну колбу ємністю 1000 мл, розчиняють у 950 мл води і встановлюють рН отриманого розчину кислотою оцтовою безводною до значення 3,0, доводять об’єм розчину водою до позначки і перемішують;
* рухома фаза: буферний розчин з рН 3,0 : 80% ацетонітрилу і 20% ізопропанолу (82:18)
* швидкість рухомої фази – 1,3 мл/ хв.;
* детектування за довжини хвилі 254 нм;
* температура колонки – 300 С;
* об’єм проби, що вводиться – 20 мкл.

В обраних оптимальних умовах була проведена перевірка придатності хроматографічної системи згідно з ДФУ.

На рис. 8 наведена хроматограма розчину порівняння флуконазолу.

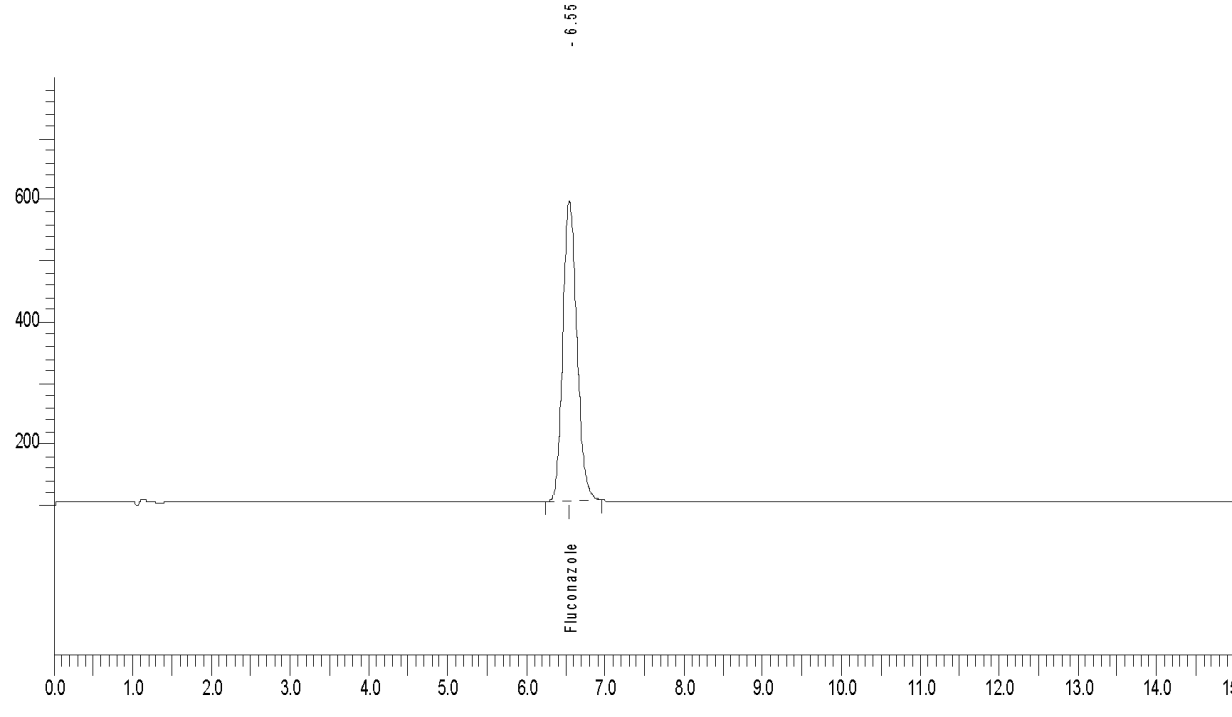


Рис. 8. Хроматограма розчину порівняння флуконазолу.

За результатами перевірки придатності хроматографічної системи для розроблених методик кількісного визначення флуконазолу ефективність хроматографічної колонки, яка була розрахована за піком флуконазолу з 5 паралельних хроматограм розчинів порівняння, складає 9547 теоретичних тарілок; відносне стандартне відхилення (у відсотках), розраховане для площі піку становить 0,27%; коефіцієнт симетрії піку дорівнює 1,09.

Виходячи з одержаних даних, нами запропоновано встановити такі оптимальні вимоги тесту на придатність хроматографічної системи:

* ефективність колонки, розрахована за піками флуконазолу – не менше 2000 теоретичних тарілок;
* коефіцієнт симетрії піку не більше 1,5;
* відносне стандартне відхилення площі піків не більше 2,0%.

За аналогією експериментально були встановлені оптимальні умови *кількісного визначення тербінафіну гідрохлориду у лікарських формах – кремі та спрею*.

Отримані результати кількісного визначення флуконазолу та тербінафіну гідрохлориду в лікарських формах свідчать про те, що розроблені методики дозволяють аналізувати їх без попереднього розділення від допоміжних речовин.

**ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

У дисертації наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, що виявляється в обґрунтуванні та розробці чутливих, простих у виконанні спектрофотометричних та хроматографічних методик кількісного аналізу лікарських засобів протигрибкової дії похідних азолів та нафтилметиленаміну.

1. На підставі даних наукової літератури проаналізовано тенденції поширеності грибкових захворювань, проведено дослідження вітчизняного фармацевтичного ринку антимікотиків, обґрунтовано доцільність розробки та впровадження нових, простих у виконанні, доступних методів кількісного аналізу для обраної групи лікарських засобів.
2. Визначено основні оптичні характеристики електронних спектрів поглинання лікарських речовин похідних азолів і нафтилметиленаміну в амфіпротних, протогенних та протофільних розчинниках.
3. Науково обґрунтована та експериментально доведена можливість застосування у спектрофотометричному аналізі алізаринового червоного С і алюмінону, як чутливих аналітичних кольорореагентів для кількісного визначення досліджуваних речовин, встановлені оптимальні умови проведення фотометричних реакцій алізаринового червоного С з кетоконазолом і клотримазолом, алюмінона з тербінафіну гідрохлоридом і міконазолу нітратом та розраховані аналітичні показники чутливості. Встановлено, що реакції характеризуються достатньою чутливістю - межі виявлення становлять 3,83-3,95 мкг/мл за реакцією з алізариновим червоним, 11,32 - 18,20 мг/мл за реакцією з алюміноном.
4. На основі проведених квантово-хімічних розрахунків запропоновано напрями перебігу реакцій між алізариновим червоним С і кетоконазолом та клотримазолом; між алюміноном і тербінафіну гідрохлоридом та міконазолу нітратом за утворенням іонних асоціатів.
5. Визначено коефіцієнти стехіометричних співвідношень “реагент – лікарська речовина” з утворення продуктів реакцій. Показано, що алізариновий червоний С реагує з лікарськими речовинами у співвідношенні 1:1, алюмінон - у співвідношенні 1:2.
6. Розроблено доступні, прості у виконанні, чутливі, експресні методики кількісного спектрофотометричного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі сучасних лікарських препаратів Доведено, що розроблені методики за такими характеристиками, як специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, діапазон застосування та робасність є валідними.
7. Обґрунтовано оптимальні умови визначення флуконазолу і тербінафіну гідрохлориду методом високоефективної рідинної хроматографії та розроблено методики їх кількісного визначення у лікарських формах промислового виробництва.
8. Показана можливість застосування запропонованих методик для визначення якості лікарських засобів, зокрема в роботі Державних інспекцій з контролю якості лікарських засобів та ВТК хіміко-фармацевтичних заводів.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Демченко В. А. Аналитический обзор фармацевтического рынка противогрибковых лекарственных средств на примере производных азолов / В. А. Демченко // Запорож. мед. журн. – 2006. - № 2 (35). – С. 158-168.
2. Демченко В. О. Спектрофотометричне визначення кетоконазолу у таблетках / В. О. Демченко, В. В. Петренко // Фармаком. - 2006. - № 4. – С. 73-79. (Дисертант самостійно здійснила пошук і аналіз даних наукової літератури, виконала експеримент, обробку результатів, підготувала статтю до друку)
3. Демченко В. О. Вивчення реакції алізаринового червоного С з кетоконазолом / В. О. Демченко, Б. О. Прийменко, В. В. Петренко // Запорож. мед. журн. – 2007. - № 3 (42). – С. 125-126. (Дисертант самостійно здійснила пошук і аналіз даних наукової літератури, проведення експерименту, обробку результатів, підготувала статтю до друку)
4. Демченко В. О. Спектрофотометричне визначення кетоконазолу у кремі / В. О. Демченко, В. В. Петренко // Фармац. журн. – 2007. – № 5. – С. 77-83. (Дисертант самостійно здійснила пошук і аналіз даних наукової літератури, виконала експеримент, обробку результатів, підготувала статтю до друку)
5. Демченко В. О. Кількісне визначення клотримазолу у лікарських формах методом спектрофотометрії за реакцією з алізариновим червоним С / В. О. Демченко, В. В. Петренко // Запорож. мед. журн. – 2008. - № 1 (46). – С. 136-141. (Дисертант самостійно здійснила пошук і аналіз даних наукової літератури, виконала експеримент, обробку результатів, підготувала статтю до друку)
6. Демченко В. О. Спектральна характеристика лікарських засобів похідних імідазолу (кетоконазол, клотримазол, міконазолу нітрат), 1,2,4-триазолу (флуконазол) та нафталіну (тербінафіну гідрохлорид) / В. О. Демченко, В. П. Буряк, В. В. Петренко // Фармац. журн. – 2008. - № 2.- С. 77 - 86. (Дисертант самостійно здійснила пошук і аналіз даних наукової літератури, виконала експеримент, обробку результатів, підготувала статтю до друку)
7. Пат. 26958 Україна, МПК (2006) G01N21/00. Спосіб кількісного визначення кетоконазолу у супозиторіях / Демченко В. О., Петренко В. В.– № u200706468 ; заявл. 11.06.2007 ; опубл. 10.10.2007, Бюл. № 16, (І ч.). (Дисертант самостійно здійснила патентний пошук, розробила методику кількісного визначення кетоконазолу, підготувала формулу винаходу, опис до патенту)
8. Пат. 29545 Україна, МПК (2006) G01N21/00. Спосіб кількісного визначення міконазолу нітрату у лікарських препаратах / Демченко В. О., Петренко В. В. – № u200711983 ; заявл. 30.10.2007 ; опубл. 10.01.2008, Бюл. № 1. (Дисертант самостійно здійснила патентний пошук, розробила методику кількісного визначення міконазолу нітрату, підготувала формулу винаходу, опис до патенту)
9. Демченко В. О. Валідаційні характеристики методики кількісного визначення супозиторіїв з кетоконазолом / В. О. Демченко, В. В. Петренко // Фармац. часопис. – 2007. - № 3 (3). – С. 33-36. (Дисертант самостійно здійснила пошук і аналіз даних наукової літератури, виконала експеримент, обробку результатів, підготувала статтю до друку)
10. Розробка методів аналізу клотримазолу в порошку та лікарських формах / В. О. Кісельова, В. В. Петренко, О. П. Швайка, І. В. Бушуєва // Актуальні питання фармац. науки та практики : міжрегіон. наук.-практ. конф., 23-24 листоп. 1995 р. : тези доп. - Запоріжжя, 1995. - С. 148-149. (Дисертант самостійно виконала експеримент, обробку результатів, підготувала тези до друку)
11. Розробка методів аналізу біфоназолу в порошку та мазі / В. О. Кісельова, В. В. Петренко, О. П. Швайка, І. Г. Постригань // Актуальні питання фармац. науки та практики : міжрегіон. наук.-практ. конф., 23-24 листоп. 1995 р. : тези доп. - Запоріжжя, 1995. - С. 149. (Дисертант самостійно виконала експеримент, обробку результатів, підготувала тези до друку)
12. Дослідження протигрибкової активності та швидкості вивільнення біфоназолу з мазевих основ / В. О. Кісельова, В. Р. Стець, І. В. Бушуєва, І. Г. Постригань, А. М. Малиновська // Актуальні питання фармац. науки та практики : міжрегіон. наук.-практ. конф., 23-24 листоп. 1995 р. : тези доп. - Запоріжжя, 1995. - С. 112. (Дисертант самостійно виконала експеримент, обробку результатів, підготувала тези до друку)
13. Демченко В. А. Валидационные характеристики методики количественного определения таблеток кетоконазола / В. А. Демченко // Сучасні екологічні проблеми та молодь-ІІІ. Секція 3. Роль хім. знань у вирішенні питань охорони навколишнього середовища : міжвуз. студент. наук. конф. : тези доп. – Запоріжжя, 2006. – Ч. 3. - С. 11-12.
14. Демченко В. А. Исследование регионального рынка лекарственных средств противогрибкового действия для системного применения и определение наиболее эффективных среди них / В. А. Демченко // Сучасні досягнення фармац. науки та практики : всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 28-29 березня 2006 р. : тези доп. – Запоріжжя, 2006. – Вип. XV, Т. 2. – С. 472-473.
15. Демченко В. О. Моніторинг вітчизняного фармацевтичного ринку протигрибкових препаратів для місцевого застосування / В. О. Демченко // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : І-а міжнар. наук.-практ. конф., 6-7 квітня 2006 р. : тези доп. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2006. – С. 112-113. .
16. Демченко В. О. Розробка фотометричних методів кількісного визначення лікарських засобів, похідних ді- і тріазолів / В. О. Демченко, В. П. Буряк // Досягнення в галузі аналітичної, судово-медичної, клінічної токсикології та наркології : всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 21-23 листоп. 2007 р. : тези доп. – Запоріжжя, 2007. – С. 281-282. (Дисертант самостійно здійснила пошук і аналіз літературних даних, виконала експеримент, підготувала доповідь і тези доповіді до друку)
17. Застосування алюмінону для кількісного визначення тербінафіну гідрохлориду методом спектрофотометрії / В. О. Демченко // Сьогодення та майбутнє фармації : всеукр. конгрес., 16-19 квітня 2008 р. : тези доп. - Харків. – 2008. – С. 86.
18. Демченко В.А. Новые аспекты применения алюминона в практике фармацевтического анализа // Аналитика и аналитики : II Междунар. форум, 22-26 сент. 2008 г. : тез. докл. – Воронеж, 2008. – С. 526.

**Демченко В.О.** Аналітичні дослідження в ряді протигрибкових лікарських засобів похідних азолів та нафтилметиленаміну.– Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02. – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2009.

Дисертацію присвячено розробці чутливих, простих у виконанні спектрофотометричних та хроматографічних методик кількісного визначення лікарських речовин протигрибкової дії похідних азолів та нафтилметиленаміну в їх лікарських формах.

В ході роботи експериментально встановлено оптимальні умови та аналітичні характеристики реакцій алізаринового червоного С з кетоконазолом і клотримазолом, алюмінона з тербінафіну гідрохлоридом і міконазолу нітратом. На підставі цих реакцій розроблено доступні методики кількісного спектрофотометричного визначення досліджуваних речовин в сучасних лікарських препаратах та наведено для них основні валідаційні характеристики.

Обґрунтовано оптимальні умови визначення флуконазолу і тербінафіну гідрохлориду методом високоефективної рідинної хроматографії, які покладені в основу методик їх кількісного визначення у лікарських формах промислового виробництва.

**Ключові слова**: протигрибкові лікарські засоби, похідні азолів і нафтилметиленаміну, спектрофотометрія, алізариновий червоний С, алюмінон, валідація, високоефективна рідинна хроматографія.

**Демченко В. А.** Аналитические исследования в ряду противогрибковых лекарственных средств, производных азолов и нафтилметиленамина. - Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02. - фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Львовский национальный медицинский университет имени Данилы Галицкого, Львов МЗ Украины, 2009.

Диссертационная работа посвящена разработке чувствительных, простых в выполнении спектрофотометрических и хроматографических методик количественного определения лекарственных веществ противогрибкового действия, производных азолов и нафтилметиленамина в их лекарственных формах.

Определены основные оптические характеристики электронных спектров поглощения лекарственных веществ, производных азолов и нафтилметиленамина в амфипротных, протогенных и протофильных растворителях.

Научно обоснована и экспериментально доказана возможность применения ализаринового красного С и алюминона в фармацевтическом анализе для количественного определения лекарственных веществ, производных азолов и нафтилметиленамина. Определены условия фотометрических реакций ализаринового красного С с кетоконазолом и клотримазолом, алюминона с тербинафина гидрохлоридом и миконазола нитратом. Установлено, что оптимальными условиями являются этанольно-водная среда, температура 18-25ос.

Рассчитаны аналитические показатели чувствительности реакций ализаринового красного С с кетоконазолом и клотримазолом, алюминона с тербинафина гидрохлоридом и миконазола нитратом. Доказано, что реакции характеризуются достаточной чувствительностью - границы определения составляют 3,83-3,95 мкг/мл и 11,32-18,20 мг/мл соответственно.

На основе проведенных квантово-химических расчетов электронной плотности молекул реагентов и исследуемых лекарственных веществ предложены направления протекания реакций с образованием ионных ассоциатов.

Спектрофотометрическими методами установления состава (непрерывных изменений, изомолярных серий) определены коэффициенты стехиометрических соотношений “реагент - лекарственное вещество”. Показано, что ализариновый красный С реагирует с кетоконазолом и клотримазолом в соотношении 1:1, а алюминон с тербинафином гидрохлоридом и миконазолом нитратом в соотношении 1:2 при содержании спирта 28% в реакционной системе.

Полученные результаты были положены в основу разработки спектрофотометрических методик количественного определения исследуемых лекарственных веществ в их лекарственных формах.

Предварительно были найдены границы концентраций лекарственных веществ, в которых соблюдалась подчиняемость светопоглощения закону Бера и рассчитаны величины удельных показателей поглощения. Для получения более точных результатов количественное определение проводили методом стандарта. Растворы сравнения готовили из лекарственных веществ, субстанции которых отвечали требованиям аналитической нормативной документации.

Сущность разработанных методик количественного определения заключалась в обработке исследуемой пробы цветореагентом при комнатной температуре с последующим измерением оптической плотности полученных окрашенных растворов.

Для разработанных методик определены валидационные характеристики, устанавливаемые ГФУ для методик количественного определения. Показано, что по таким характеристикам, как специфичность, линейность, правильность, диапазон применения, сходимость и робасность, предлагаемые методики являются валидными. Доказано, что разработанные методики отличаются простотой выполнения, доступностью и могут применяться в контроле качества, в том числе, в работе Государственных инспекций по контролю качества лекарственных средств.

Обоснованы оптимальные условия определения флуконазола и тербинафина гидрохлорида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и на их основе разработаны методики количественного определения данных веществ в лекарственных формах промышленного производства. Показано, что количественному определению лекарственных веществ по разработанным методикам не мешают вспомогательные вещества, что позволяет их анализировать без предварительного разделения.

**Ключевые слова**: противогрибковые лекарственные средства, производные азолов и нафтилметиленамина, спектрофотометрия, ализариновый красный С, алюминон, валидация, высокоэффективная жидкостная хроматография.

**Demchenko V. A.** Analytical researches in a number of antifungal medical products of derivatives azoles and naphthylmethylenamin”. - The manuscript.

Dissertation for the Candidates` scientific degree in Pharmacy on the speciality 15.00.02. - Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. - Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Public Health of Ukraine, Lviv, 2009.

The Dissertation is devoted to working out of sensitive, easy-to-use spectrophotometric and chromatographic methods of quantitative determination of medical products with antifungal action derivatives of azoles and naphthylmethylenamine.

Optimal conditions and analytical characteristics of photometric reactions of alizarin red S with ketoconazole and clotrimazole and aluminon with terbinafine hydrochloride and miconazole nitrate were defined. Accessible techniques of quantitative spectrophotometric definition of investigated substances in medicinal forms industrial by producted on the basis of these reactions and the basic validational characteristics for them were developed.

Optimal determination conditions of fluconazole and terbinafine hydrochloride are determined by method of high performance liquid chromatography. Techniques of quantitative definition of these substances in the commercial dosage forms are developed on their basis.

**Keywords**: antifungal medical products of derivatives azoles and naphthylmethylenamine, spectrophotometry, alizarin red S, aluminon, validation, high performance liquid chromatography.

Підписано до друку 12.05.2009. Гарнітура Times New Roman

Папір друкарський. Формат 60×84 1/16. Умовн. друк. арк. 0,9.

Наклад – 100 прим. Замовлення № 4031.

Надруковано з оригінал-макету в типографії

Запорізького державного медичного університету

м. Запоріжжя, пр. Маяковського 24, тел. 34-97-82.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>